



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 31 292 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 07 H 21/00
C 07 H 21/02
C 07 H 21/04
C 12 P 19/34
C 12 Q 1/68
C 12 Q 1/14

⑳ Aktenzeichen: 197 31 292.6
㉔ Anmeldetag: 21. 7. 97
㉕ Offenlegungstag: 28. 1. 99

// (C12Q 1/68,C12R 1:44)(C12Q 1/68,C12R 1:445)(C12Q 1/14, C12R 1:44)(C12Q 1/14, C12R 1:445)(C12P 19/34,C12R 1:44) (C12P 19/34,C12R 1:445)

㉚ Anmelder:
BioteCon Gesellschaft für Biotechnologische
Entwicklung und Consulting mbH, 13355 Berlin, DE

㉛ Vertreter:
Patentanwälte Dr. Boeters, Bauer, Dr. Forstmeyer,
81541 München

㉞ Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

㉟ Entgegenhaltungen:

FR	27 43 367 A1
EP	06 69 399 A2
WO	96 41 878 A1
WO	96 24 686 A2
WO	9 33 186 A1
WO	9 25 281 A1
WO	9 18 305 A1

Medline AN 97237711 [Microbiology, 143 (1997)
823-
834];
Medline 92392923 [Biochimie 74 (1992) 585-588]
Medline 96156105 [J. Clinical Microbiol. 33 (1995)
3091-3095];
Medline 95269967 [FEMS Microbiol. Lett. 128
(1995)
119-125];
Medline 97102183 [Zentralblatt f. Bakteriologie. 285
(1996) 20-28];
Medline 97034110 [Clinical-Infect. Diseases 23
(1996) 475-480];
Medline 97005372 [J. Appl. Bacteriol. 80 (1996)
244-251];
Medline 96407006 [Nucleic Acids Res. 24 (1996)
3381-3391];
Medline 96291654 [FEMS Microbiol. Lett. 140
(1996)
111-119];
Medline 92350943 [Re. Microbiol. 143 (1992)
37-46];

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉙ Nucleinsäuremolekül, Kit und Verwendung

㉚ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäuremolekül bzw. -moleküle sowie ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Staphylococcus*, insbesondere *Staphylococcus aureus*. Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Testkit bzw. Testkits zur Durchführung der genannten Nachweisverfahren.

DE 197 31 292 A 1

DE 197 31 292 A 1

Beschreibung

Ein Bakterium von hoher klinischer Relevanz ist das gram-positive Bakterium *Staphylococcus aureus*. Es ist eines der häufigsten Verursacher von nosocomialen (im Krankenhaus übertragenen) Infektionen, deren Verbreitungen durch das Auftreten verschiedener Antibiotikaresistenzen (z. B. Resistenz gegen Methicillin und Vancomycin) schwer zu kontrollieren sind. *Staphylococcus aureus* gehört zudem zu den häufigsten Verursachern von Lebensmittelvergiftungen, welche meist durch Enterotoxine verursacht werden. Das häufige Vorkommen von *Staphylococcus aureus* in Lebensmittelprodukten erfordert daher eine regelmäßige Untersuchung potentiell kontaminierter Produkte. Konventionelle mikrobiologische Verfahren zum Nachweis von *Staphylococcus aureus* sind sehr zeitaufwendig (mindestens 4 Tage). Es besteht daher ein großer Bedarf nach alternativen Methoden, mit denen die Anwesenheit von *Staphylococcus aureus* im Verlauf des Produktionsprozesses (von den Rohstoffen bis hin zum fertigen Produkt) schnell und sicher diagnostiziert werden kann.

Für den routinemäßigen Einsatz zum Nachweis von Mikroorganismen sind in den letzten Jahren eine Reihe neuer Methoden entwickelt worden. Hierzu zählen immunologische Verfahren, die auf dem Einsatz polyvalenter oder monoklonaler Antikörper beruhen, und Verfahren, bei denen Nukleinsäure-Sonden zum Nachweis mittels Hybridisierung an keimspezifische Nukleinsäuren eingesetzt werden. Als weitere Methoden werden diejenigen Verfahren beschrieben, die auf einer spezifischen Nukleinsäure-Amplifikation basieren, mit oder ohne anschließende Bestätigungsreaktion durch Nukleinsäure-Hybridisierung. Eingesetzte Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren sind z. B. die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) [US Patente 4,683,195; 4,683,202; und 4,965,188], die Ligase-Kettenreaktion [WO Veröffentlichung 89/09835], die "self-sustained sequence replication" [EP 329,822], das "transcription based amplification system" [EP 310,229] und das Q β RNA-Replikase-System [US Patent 4,957,858].

Die genannten auf Nukleinsäuren basierenden Verfahren sind so sensitiv, daß, anders als bei konventionellen mikrobiologischen Verfahren, eine langwierige Anreicherung des nachzuweisenden Mikroorganismus aus der zu untersuchenden Probe entfällt. Eine Untersuchung auf An- oder Abwesenheit des jeweiligen Mikroorganismus ist daher bei Anwendung der genannten auf Nukleinsäuren basierenden Verfahren in der Regel innerhalb eines Arbeitstages abgeschlossen. Insbesondere wenn für den Nachweis mittels konventioneller Verfahren mehrere Tage bis Wochen benötigt werden, wird hierdurch eine erhebliche Zeitverkürzung erreicht.

In letzter Zeit wurden eine Reihe von Schnelltests entwickelt, mit denen die Anwesenheit von *Staphylococcus aureus* deutlich verkürzt werden kann. Zu diesen gehören Koagulase-Tests, verschiedene Agglutinations-Tests, TNase-Tests (Enzymaktivität, monoklonale Antikörper), DNA-Hybridisierungs-Tests und PCR-Tests [zur Übersicht siehe BRAKSTAD und MAELAND, (1995), APMIS 103, 209–218]. Bezüglich Schnelligkeit und Spezifität sind PCR-Tests den anderen Verfahren überlegen. Die bisher beschriebenen PCR-Tests zum spezifischen Nachweis der Spezies *Staphylococcus aureus* basieren auf dem Gen für thermostabile Nuklease [nuc, Brakstad et al., (1992), J. Clin. Microbiol. 30, 1654–1660] bzw. auf einem für Methicillin-Resistenz essentiellen Regulatorgen (femA), welches spezifisch für *Staphylococcus aureus* ist [Ünal et al., (1992), J. Clin. Microbiol. 30 1685–1691; Vannuffel et al., (1995), J. Clin. Microbiol., 33, 2864–2867]. Mit Hilfe dieser PCR-Systeme gelang der Nachweis aller untersuchten Spezies von *Staphylococcus aureus*. Unklar ist jedoch die Frage, ob mit diesen PCR-Systemen auch der Nachweis von Koagulase-negativen Stämmen der Spezies *Staphylococcus aureus* möglich ist.

Ziel der hier dargestellten Erfindung war die Etablierung eines PCR-Systems, dessen Einsatz als Primer und/oder Sonden eine möglichst vollständige Erfassung aller Vertreter der Spezies *Staphylococcus aureus* sicherstellt.

Je nach Größe der zu detektierenden Gruppe von Mikroorganismen und der evolutionären Verwandtschaft von abzugrenzenden (nicht zu erfassenden) Mikroorganismen erfordert ein auf differentiellen DNA-Sequenzen basierender Nachweis sehr umfangreiche Vorarbeiten, um jeweils geeignete DNA-Sequenzen mit der gewünschten Spezifität zu finden. Die hier dargelegte Erfindung betrifft solche DNA-Sequenzen, mit denen der Schnellnachweis von Bakterien der Gattung *Staphylococcus*, insbesondere von *Staphylococcus aureus* möglich ist.

Beschreibung der Erfindung

Zur Detektion von spezifischen Mikroorganismen mittels Nukleinsäure-Hybridisierung oder -Amplifikation werden keimspezifische Oligonukleotide eingesetzt. keimspezifische Oligonukleotide sind Nukleinsäuren, 10 bis 250 Basen (vorzugsweise 15 bis 30 Basen) lang, deren Basensequenz charakteristisch für einen spezifischen Mikroorganismus oder eine Gruppe von Mikroorganismen ist. Eine Hybridisierung an DNA bzw. eine Amplifikation von DNA bei Einsatz dieser keimspezifischen Oligonukleotide (z. B. als Primer oder Sonden) mit den oben genannten Verfahren kann, unter geeigneten Reaktionsbedingungen, nur dann erfolgen, wenn die DNA der jeweils nachzuweisenden Mikroorganismen anwesend ist.

Prokaryontische Ribosomen beinhalten in der Regel drei distinkte Nukleinsäurekomponenten, welche allgemein als 5S, 16S und 23S rRNA (ribosomale Ribonukleinsäure) bekannt sind. Die genetische Information für diese Ribonukleinsäuren (rDNA) ist im Genom typischerweise in Form von Tandems angeordnet. Die typische Organisation einer solchen Einheit ist 16S-23S-5S, wobei die drei Gene durch kurze hypervariable intergenische Regionen voneinander getrennt sind. Die Einheiten sind im Genom mehrfach vorhanden, wobei die Anzahl der sich wiederholenden Einheiten in verschiedenen Bakterien variieren kann. Die hohe Konservierung der DNA-Sequenz im Bereich der 16S rDNA, der 23S rDNA und der 5S rDNA über das gesamte Bakterienreich ermöglicht ein Design von nicht-spezifischen Oligonukleotiden auch ohne genaue Kenntnis der DNA-Sequenzen der zu untersuchenden Mikroorganismen. Solche nicht-spezifischen Oligonukleotide sind charakteristisch für eine größere, in der Regel phylogenetisch verwandte Gruppe von Mikroorganismen. Durch Einsatz dieser nicht-spezifischen Oligonukleotide gelingt dem Fachmann, z. B. nach entsprechenden Vorversuchen durch DNA-Amplifikation mittels PCR, die Isolation von rDNA-Fragmenten, z. B. der 23S/5S intergenischen Region eines beliebigen Mikroorganismus. Durch DNA-Sequenzierung kann dann die Sequenz der hypervariablen intergenischen Regionen des betreffenden Mikroorganismus bestimmt werden.

DNA-Sequenzierung der 23S/5S intergenischen Region einer möglichst großen Anzahl nachzuweisender Bakterien

(z. B. von verschiedenen Staphylococcus-Spezies) einerseits und nachfolgender Vergleich dieser DNA-Sequenzen andererseits erlauben das Auffinden von DNA-Bereichen, die in der untersuchten Gruppe (z. B. alle Staphylococcus-Spezies) nicht oder nur unwesentlich verändert sind.

DNA-Sequenzierung der 23S/5S intergenischen Region einer möglichst großen Anzahl von nicht-nachzuweisenden Bakterien (z. B. allen Bakterien, die nicht zur Gattung Staphylococcus gehören) einerseits und nachfolgender Vergleich dieser DNA-Sequenzen mit der Sequenz der nachzuweisenden Bakterien (z. B. verschiedene Staphylococcus-Spezies) andererseits erlauben das Auffinden von DNA-Sequenzen, die für die nachzuweisenden Bakterien (z. B. alle Staphylococcus-Spezies) charakteristisch sind. Aus diesen DNA-Sequenzen können wiederum Oligonukleotide abgeleitet werden, die als Primer und/oder Sonden in auf Nukleinsäuren basierenden Verfahren einsetzbar sind, mit dem Ziel, die jeweilige Gruppe von Bakterien (z. B. alle Spezies der Gattung Staphylococcus) spezifisch nachzuweisen.

Die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen keimspezifischen Oligonukleotide zum Nachweis von Bakterien der Gattung Staphylococcus, insbesondere Bakterien der Spezies Staphylococcus aureus, entsprechen der 23S/5S intergenischen Region und dem direkt angrenzenden Bereich der 23S rDNA und/oder der 5S rDNA. Die DNA-Sequenz in dieser Region wurde für eine Vielzahl von Bakterien bestimmt. Nach exakten Sequenzvergleichen wurden keimspezifische Nukleinsäuresequenzen bestimmt, von denen Primer und/oder Sonden für einen Einsatz in einem Spezies-/Genus-spezifischen Nachweisverfahren abgeleitet werden können.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird gemäß einer Ausführungsform durch ein Nucleinsäuremolekül gelöst, das dadurch gewinnbar ist, daß man

- (a) in an sich bekannter Weise aus einem Staphylococcus-Stamm (erster Stamm) genomische DNA isoliert,
- (b) in an sich bekannter Weise die 23S/5S-intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (erstes Amplifikationsprodukt),
- (c) mit einem zweiten, dritten und/oder nten Staphylococcus-Stamm jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomischen DNA isoliert, die 23S/5S intergenische Region mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, drittes, . . . , ntes Amplifikationsprodukt),
- (d) in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsprodukts gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c) vergleicht und
- (e) als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül isoliert und gewinnt, mit dessen Hilfe sich eine nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus Staphylococcus von einer nicht nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus Staphylococcus anhand von Unterschieden an mindestens einer Nucleotidposition im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.

Bei den Stufen (d) und (e) kann man auch so vorgehen, daß man

- (d) die DNA-Sequenz der Amplifikationsprodukte nach (b) und (c) bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsproduktes nach (b) mit der DNA-Sequenz der Amplifikationsprodukte nach (c) vergleicht und
- (e) basierend auf der unterschiedlichen DNA-Sequenz einer nachzuweisenden und nicht nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus Staphylococcus einen Primer oder eine Sonde zum Nachweis von Bakterien der Gattung Staphylococcus gewinnt.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 1 oder der hierzu komplementären Sequenz.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Nucleinsäuremolekül mit gegenüber einem Nucleinsäuremolekül gemäß SEQ ID NO 1 verkürzter Sequenz, und zwar einer Sequenz

- (i) des Bereichs oder im Bereich der Nucleotidpositionen 54 bis 83 oder
- (ii) des Bereichs oder im Bereich der Nucleotidpositionen 100 bis 166.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Nucleinsäuremolekül mit gegenüber einem Nucleinsäuremolekül gemäß SEQ ID NO 1 verkürzter Sequenz, nämlich

- (i) der SEQ ID NO 2 oder
- (ii) der SEQ ID NO 3 oder
- (iii) der SEQ ID NO 4 oder
- (iv) der zu (i), (ii) und (iii) jeweils komplementären Sequenz.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein weiteres bzw. anderes Nucleinsäuremolekül, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es hinsichtlich seiner Sequenz bei mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden seiner Nucleotidkette

- (i) mit einem erfindungsgemäßen vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremolekül identisch ist oder
- (ii) in 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden mit einem erfindungsgemäßen vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremolekül übereinstimmt oder
- (iii) in 8 von 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden mit einem erfindungsgemäßen vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremolekül übereinstimmt oder

(iv) zu mindestens 90% mit einem erfindungsgemäß vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremolekül homolog ist.

Ein derartiges Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es 10 bis 250 und vorzugsweise 15 bis 30 Nucleotide lang ist.

5 Ein Beispiel für ein Nucleinsäuremolekül gemäß (i) ist durch die SEQ ID NO 5 gekennzeichnet.

Ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegt.

Ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es

- 10 (i) als DNA oder
- (ii) als (i) entsprechende RNA oder
- (iii) als PNA (siehe im folgenden) vorliegt,

wobei das Nucleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, an sich bekannten Weise modifiziert ist.

15 Ein derartiges Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß das Nucleinsäuremolekül dadurch modifiziert ist, daß bis zu 10% der Nucleotide, insbesondere 1 oder 2 Nucleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analoge Bausteine ersetzt sind, insbesondere durch Nucleotide, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen.

Ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß das Nucleinsäuremolekül dadurch oder zusätzlich dadurch modifiziert bzw. markiert ist, daß es in einer für analytische Nachweisverfahren an sich bekannten Weise ein oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase und/oder Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere eine enzymatische Reaktion, aufweist, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen.

25 Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft einen Kit für analytische Nachweisverfahren, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Gattung Staphylococcus, gekennzeichnet durch ein oder mehrere erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft eine Verwendung von einem oder mehreren erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen oder eines erfindungsgemäßen Kits zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien, welche einer Gruppe von Bakterien der Gattung Staphylococcus angehören.

30 Diese Verwendung kann dadurch gekennzeichnet sein, daß die Gruppe von Bakterien der Gattung Staphylococcus verschiedene Stämme von Staphylococcus aureus umfaßt.

Diese Verwendung kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es sich bei der Gruppe von Bakterien der Gattung Staphylococcus ausschließlich um Staphylococcus aureus-Stämme handelt.

35 Diese Verwendungen können dadurch gekennzeichnet sind, daß man eine Nucleinsäurehybridisierung und/oder eine Nucleinsäureamplifikation durchführt.

Diese Verwendung kann dadurch gekennzeichnet sein, daß man eine Polymerase-Kettenreaktion als Nucleinsäureamplifikation durchführt.

40 Diese Verwendungen können dadurch gekennzeichnet sein, daß man den Nachweis dadurch durchführt, daß man die nachzuweisenden Bakterien von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nucleotidposition im Bereich eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls unterscheidet.

Diese Verwendung kann dadurch gekennzeichnet sein, daß man anhand von Unterschieden im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls der SEQ ID NO 1 unterscheidet.

45 Zum Nachweis der jeweiligen Gruppe von Mikroorganismen werden Nukleinsäuren, vorzugsweise genomische DNA, zunächst aus den in einer zu untersuchenden Probe bzw. Bakterienkultur enthaltenen Zellen freigesetzt. Mittels Nukleinsäurehybridisierung kann dann, und zwar unter Einsatz der erfindungsgemäßen keimspezifischen Oligonukleotide als Sonde, der direkte Nachweis von keimspezifischen Nukleinsäuresequenzen in der zu untersuchenden Probe erfolgen. Geeignet hierzu sind verschiedene dem Fachmann bekannte Verfahren, wie z. B. "Southern blot" oder "dot blot".

50 Bevorzugt ist jedoch, vor allem wegen der höheren Empfindlichkeit, ein indirektes Nachweisverfahren, bei dem die gesuchten DNA/RNA-Sequenzen zunächst mittels der o.g. Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren, vorzugsweise PCR, amplifiziert werden.

Die Amplifikation von freigesetzter DNA/RNA unter Verwendung der genannten Verfahren kann unter Einsatz von keimspezifischen Oligonukleotiden als Primer erfolgen. Dabei werden nur in dem Fall spezifische Amplifikate gebildet, in dem DNA/RNA des nachzuweisenden Mikroorganismus anwesend ist. Durch eine nachgeschaltete Detektionsreaktion unter Verwendung von keimspezifischen Oligonukleotiden als Sonden kann die Spezifität des Nachweisverfahrens erhöht werden. Für diese nachgeschaltete Detektionsreaktion ist ebenso die Verwendung von nichtkeimspezifischen Oligonukleotiden als Sonden möglich.

60 Alternativ kann die Nukleinsäure-Amplifikation auch in Anwesenheit eines oder mehrerer nicht-spezifischer Oligonukleotide durchgeführt werden, so daß möglicherweise auch DNA/RNA anderer, nicht-nachzuweisender Mikroorganismen amplifiziert werden kann. Ein derartiges Amplifikationsverfahren ist in der Regel weniger spezifisch und sollte daher durch eine nachfolgende Detektionsreaktion mit einem oder mehreren keimspezifischen Oligonukleotid(en) als Sonde(n) abgesichert werden.

65 Dem Fachmann sind verschiedene Verfahren bekannt, mit denen die bei den indirekten Verfahren entstehenden Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden können. Dazu gehören u.A. die Visualisierung mittels Gelelektrophorese, die Hybridisierung von Sonden an immobilisierte Reaktionsprodukte [gekoppelt an Nylon- oder Nitrocellulose-Filter ("Southern blots") oder z. B. an "beads" oder Mikrotiterplatten] und die Hybridisierung der Amplifikationsprodukte an immobilisierte Sonden (z. B. "reverse dot blots" oder mit Sonden gekoppelte "beads" oder Mikrotiterplatten).

Es sind eine Vielzahl verschiedener Varianten beschrieben, mit denen keimspezifische Oligonukleotide (z. B. Sonden und Primer) für die beschriebenen direkten oder indirekten Nachweisverfahren markiert bzw. modifiziert werden können. So können diese beispielsweise radioaktive, farbige, fluoreszierende oder anderweitig modifizierte bzw. modifizierende Gruppen enthalten, beispielsweise Antikörper, Antigene, Enzyme bzw. andere Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen. Sonden bzw. Primer können entweder natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte doppelsträngige oder einzelsträngige DNA oder RNA sein bzw. modifizierte Formen von DNA oder RNA, wie z. B. PNA (bei diesen Molekülen sind die Zucker-Einheiten durch Aminosäuren oder Peptide ausgetauscht). Einzelne oder mehrere Nukleotide der Sonden oder Primer können gegen analoge Bausteine (wie z. B. Nucleotide, die in der Ziel-Nukleinsäure nicht natürlich vorkommen) ersetzt sein. Bei den o.g. indirekten Nachweisverfahren kann Detektion auch über ein intern-markiertes Amplifikat geführt werden. Dies kann z. B. über den Einbau von modifizierten (z. B. Digoxigenin- oder Fluorescein-gekoppelten) Nukleosidtriphosphaten während der Amplifikationsreaktion erfolgen.

Geeignet als erfindungsgemäße keimspezifische Oligonukleotide sind Nukleinsäuren, vorzugsweise 10 bis 250 und insbesondere 15 bis 30 Basen lang, die mindestens in einer 10 Basen langen Sequenz mit den unten angegebenen Sequenzen 1 bis 5 oder den hierzu komplementären Sequenzen übereinstimmen. Geringere Abweichungen (1 bis 2 Basen) in dieser 10 Basen langen Sequenz sind möglich, ohne daß die jeweils angegebene Spezifität bei der Amplifikation und/oder Hybridisierung verloren geht. Dem Fachmann ist bekannt, daß im Falle solcher geringeren Abweichungen die Reaktionsbedingungen entsprechend verändert werden müssen.

Die DNA-Sequenz von *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) im Bereich der 235 rDNA (1-113) und der 235/55 intergenischen Region (114-171) lautet:

(Sequenz 1 = SEQ ID NO 1)

TTTCCCAACTTCGGTTATAAGATCCCTCAAAGATGATGAGGTTAATAGGTTTCGAG
GTGGAAGCATGGTGACATGTGGAGCTGACGAATACTAATCGATCGAAGACTTAA
TCAAATAAATGTTTTGCGAAGCAAATCACTTTTACTTACTATCTAGTTTTGAAT
GTATAA

Die Sequenz im Bereich der 23S/5S-intergenischen Region wurde für 8 *Staphylococcus aureus*-Stämme sowie für mindestens je einen Vertreter folgender Spezies bestimmt: *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylosus*. Die Sequenzvergleiche ergaben, daß sich mehrere von Sequenz 1 abgeleitete Oligonukleotide für den selektiven Nachweis von Bakterien der Spezies *Staphylococcus aureus* eignen. Geeignete Bereiche für solche keimspezifischen Oligonukleotide sind die Regionen (54-83) und (100-166).

Von Sequenz 1 wurden folgende als Primer für die PCR (Sequenz 2 und Sequenz 3) bzw. als Sonde (Sequenz 4 und Sequenz 5) besonders geeignete Oligonukleotide abgeleitet:

Oligonukleotid Sa1: (Sequenz 2 = SEQ ID NO 2) 5'-GTGGAAGCATGGTGACAT-3'

Oligonukleotid Sa2: (Sequenz 3 = SEQ ID NO 3) 5'-TAAGTAAAAG TGATTTTGCT
TCG-3'

Oligonukleotid Sa3: (Sequenz 4 = SEQ ID NO 4) 5'-CATTTATTTTGATTAAGTCT-3'

Oligonukleotid Sa4: (Sequenz 5 = SEQ ID NO 5) 5'-CATTTAAATTGATTAAGTC-3'

Beispiel 1

Nachweis von Bakterien der Spezies *Staphylococcus aureus* mit der Polymerase-Kettenreaktion

Aus Reinkulturen der in Tabelle 1 aufgeführten Bakterien wurde DNA mittels Standardverfahren isoliert. Je ca. 10 bis 100 ng dieser DNA-Präparationen wurde dann in Gegenwart von je 0,6 µM Oligonukleotid Sa1 (SEQ ID NO 2) und Sa2 (SEQ ID NO 3), 200 µM dNTP's (N = A/C/G/T-Mixtur; Boehringer Mannheim), 2 mM MgCl₂, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris/HCl (pH 8,8), 0,01% Tween 20 und 0,03 U/µl Tag-Polymerase (Biomaster) in die PCR eingesetzt. Die PCR wurde in einem Perkin-Elmer 9600 Thermocycler mit dem nachfolgend aufgeführten Thermoprofil durchgeführt:

- initiale Denaturierung 94°C 3 min
- Amplifikation (35 Zyklen) 92°C 30 sek
60°C 10 sek
- finale Synthese 72°C 5 min

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Amplifikationsprodukte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid visualisiert. Das erwartete Produkt von 94 bp Länge wurde nur in den Fällen beobachtet, in denen DNA von Stämmen der Spezies *Staphylococcus aureus* anwesend war (vergleiche Tabelle 1), nicht aber bei Anwesenheit von DNA der anderen getesteten Bakterien. Nach Beendigung des Laufes wurde die in den Gelen enthaltene DNA mittels Standard-Methoden auf Nylon-Filter transferiert und zur Überprüfung der Spezifität mit einer äquimolaren Mischung der am 5'-Ende biotinylierten Oligonukleotide Sa3 (SEQ ID NO 4) und Sa4 (SEQ ID NO 5) hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in $5 \times \text{SSC}$, 2% Blocking Reagenz, 0,1% Laurylsarcosin, 0,02% SDS und 20 pmol/ml Sonde für 4 h bei 43°C. Gewaschen wurde in $2 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS für 1×5 min bei Raumtemperatur und 1×5 min bei 43°C. Die Detektion erfolgte nach Standard-Methoden mittels alkalischer Phosphatase-Konjugaten (Extravidin, Fa. SIGMA, # E-2636) in Anwesenheit von 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat und 4-Nitro-Blue Tetrazoliumchlorid (Fa. Boehringer Mannheim).

Auf den Filtern wurde nur in den Fällen eine Bande beobachtet, in denen zuvor auch eine Bande auf dem Agarose-Gel sichtbar war (siehe Tabelle 1). Somit wurde sowohl mittels PCR wie auch mittels Hybridisierung die Anwesenheit sämtlicher der 50 getesteten *Staphylococcus aureus*-Stämme nachgewiesen. Unter den insgesamt 50 getesteten *Staphylococcus aureus*-Stämmen sind 2 Koagulase-negativ (BioteCon 7030 und BioteCon 7044), welche ebenfalls mit dem PCR-Verfahren erfaßt werden. Hingegen wurde keiner der getesteten, nicht zu dieser Spezies gehörenden Bakterienstämme mit diesem System erfaßt.

Tabelle 1

Resultate der PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden Sa1 und Sa2 (SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3) und nachfolgender Hybridisierung mit den Oligonukleotiden Sa3/Sa4 (SEQ ID NO 4 und SEQ ID NO 5)

Spezies	Stammbezeichnung	PCR	Hybridisierung
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 194	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 195	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 196	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 197	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 494	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 514	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 528	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 529	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 530	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 531	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 532	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 533	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 534	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 535	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 4286	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 4287	+	+

Spezies	Stammbezeichnung	PCR	Hybridisierung	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 4288	+	+	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 4289	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7010	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7011	+	+	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7012	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7013	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7014	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7015	+	+	15
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7016	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7017	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7018	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7019	+	+	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7020	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7021	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7022	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7024	+	+	25
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7025	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7027	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7028	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7029	+	+	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7030	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7031	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7032	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7034	+	+	35
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7035	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7036	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7039	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7040	+	+	40
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7041	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7042	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7043	+	+	45
<i>Staphylococcus aureus</i>	BioteCon 7044	+	+	
<i>Staphylococcus arlettae</i>	DSM 20672	-	-	
<i>Staphylococcus auricularis</i>	DSM 20609	-	-	
<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	BioteCon 2687	-	-	50
<i>Staphylococcus caprae</i>	DSM 20608	-	-	
<i>Staphylococcus carnosus</i>	DSM 20501	-	-	
<i>Staphylococcus caseolyticus</i>	DSM 20597	-	-	55
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	DSM 20454	-	-	
<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	DSM 20260	-	-	
<i>Staphylococcus delphini</i>	DSM 20771	-	-	60
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BioteCon 515	-	-	
<i>Staphylococcus equorum</i>	DSM 20674	-	-	
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	DSM 20610	-	-	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	BioteCon 2847	-	-	65
<i>Staphylococcus hominis</i>	DSM 20328	-	-	
<i>Staphylococcus hyicus</i>	DSM 20459	-	-	

	Spezies	Stammbezeichnung	PCR	Hybridisierung
5	<i>Staphylococcus intermedius</i>	DSM 20373	-	-
	<i>Staphylococcus kloosii</i>	DSM 20676	-	-
	<i>Staphylococcus lentus</i>	DSM 6672	-	-
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	BioteCon 2681	-	-
10	<i>Staphylococcus muscae</i>	DSM 7068	-	-
	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	DSM 20359	-	-
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	BioteCon 2685	-	-
15	<i>Staphylococcus schleiferi subsp. schleiferi</i>	DSM 4808	-	-
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	DSM 6671	-	-
	<i>Staphylococcus simulans</i>	DSM 20322	-	-
	<i>Staphylococcus warneri</i>	DSM 20036	-	-
20	<i>Staphylococcus xylosus</i>	BioteCon 2683	-	-
	<i>Bacillus cereus</i>	DSM 31	-	n.d.
	<i>Bacillus coagulans</i>	DSM 1	-	n.d.
	<i>Bacillus brevis</i>	DSM 30	-	n.d.
25	<i>Bacillus megaterium</i>	DSM 32	-	n.d.
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	DSM 350	-	n.d.
	<i>Bacillus badius</i>	DSM 23	-	n.d.
30	<i>Bacillus sphaericus</i>	BioteCon 3136	-	n.d.
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	-	n.d.
	<i>Bacillus circulans</i>	BioteCon 4926	-	n.d.
	<i>Bacillus polymyxa</i>	ATCC 8523	-	n.d.
35	<i>Bacillus mycoides</i>	BioteCon 4928	-	n.d.
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	DSM 456	-	n.d.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BioteCon 682	-	n.d.
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BioteCon 2439	-	n.d.
40	<i>Pseudomonas cepacia</i>	BioteCon 672	-	n.d.
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	BioteCon 1753	-	n.d.
	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	DSM 50332	-	n.d.
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	DSM 50017	-	n.d.
45	<i>Pseudomonas pickettii</i>	BioteCon 3323	-	n.d.
	<i>Pseudomonas fragi</i>	DSM 3456	-	n.d.
	<i>Pseudomonas hydrophila</i>	BioteCon 4883	-	n.d.
	<i>Pseudomonas putida</i>	BioteCon 4884	-	n.d.
50	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	DSM 1045	-	n.d.
	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	DSM 50188	-	n.d.
	<i>Pseudomonas syringae</i>	DSM 10604	-	n.d.
55	<i>Pseudomonas mendocina</i>	DSM 50017	-	n.d.
	<i>Pseudomonas corrugata</i>	DSM 7228	-	n.d.
	<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 1267	-	n.d.
	<i>Lactobacillus viridescens</i>	BioteCon 2592	-	n.d.
60	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	DSM 5016	-	n.d.
	<i>Lactobacillus lindneri</i>	BioteCon 2599	-	n.d.
	<i>Lactobacillus fructivorans</i>	BioteCon 2598	-	n.d.
	<i>Lactobacillus casei</i>	DSM 20011	-	n.d.
65	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	DSM 5837	-	n.d.
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	BioteCon 2597	-	n.d.
	<i>Lactobacillus intestinalis</i>	DSM 6629	-	n.d.

Spezies	Stammbezeichnung	PCR	Hybridisierung
<i>Lactobacillus bif fermentans</i>	DSM 20003	-	n.d.
<i>Lactobacillus curvatus</i>	DSM 20019	-	n.d.
<i>Lactobacillus coryniformis</i> <i>subsp. torquens</i>	DSM 20004	-	n.d.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BioteCon 786	-	n.d.
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	DSM 20249	-	n.d.
<i>Lactobacillus fructosus</i>	DSM 20349	-	n.d.
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	DSM 20177	-	n.d.
<i>Lactobacillus kefir</i>	DSM 20485	-	n.d.
<i>Lactobacillus salivarius subsp.</i> <i>salivarius</i>	DSM 20492	-	n.d.
<i>Lactobacillus homohiochii</i>	DSM 20571	-	n.d.
<i>Lactobacillus sanfrancisco</i>	DSM 20663	-	n.d.
<i>Lactobacillus aviarius</i>	DSM 20655	-	n.d.
<i>Lactobacillus ruminis</i>	DSM 20403	-	n.d.
<i>Leuconostoc mesenteriodes</i> <i>subsp. mesenteriodes</i>	DSM 20240	-	n.d.
<i>Leuconostoc mesenteriodes</i> <i>subsp. dextranicum</i>	DSM 20071	-	n.d.
<i>Leuconostoc mesenteriodes</i> <i>subsp. cremoris</i>	DSM 20346	-	n.d.
<i>Leuconostoc lactis</i>	DSM 20202	-	n.d.
<i>Leuconostoc oenos</i>	DSM 20255	-	n.d.
<i>Leuconostoc gelidum</i>	DSM 5578	-	n.d.
<i>Leuconostoc carnosum</i>	DSM 5576	-	n.d.
<i>Leuconostoc citreum</i>	DSM 20188	-	n.d.
<i>Leuconostoc paramesenteroi-</i> <i>des</i>	DSM 20288	-	n.d.
<i>Leuconostoc fallax</i>	DSM 20189	-	n.d.
<i>Leuconostoc pseudomesen-</i> <i>teroides</i>	DSM 5625	-	n.d.
<i>Streptococcus downei</i>	DSM 5635	-	n.d.
<i>Streptococcus sp.</i>	DSM 6176	-	n.d.
<i>Streptococcus parauberis</i>	DSM 6631	-	n.d.
<i>Streptococcus gordonii</i>	DSM 6777	-	n.d.
<i>Streptococcus sp.</i>	DSM 20061	-	n.d.
<i>Streptococcus equinus</i>	DSM 20062	-	n.d.
<i>Streptococcus salivarius subsp.</i> <i>thermophilus</i>	DSM 20259	-	n.d.
<i>Streptococcus canis</i>	DSM 20386	-	n.d.
<i>Streptococcus cricetus</i>	DSM 20562	-	n.d.
<i>Streptococcus anginosus</i>	DSM 20563	-	n.d.
<i>Streptococcus rattus</i>	DSM 20564	-	n.d.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	DSM 20566	-	n.d.
<i>Streptococcus pleomorphus</i>	DSM 20574	-	n.d.
<i>Streptococcus iniae</i>	DSM 20576	-	n.d.
<i>Streptococcus hansenii</i>	DSM 20583	-	n.d.
<i>Streptococcus ferus</i>	DSM 20646	-	n.d.
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	DSM 20728	-	n.d.
<i>Streptococcus hyointestinalis</i>	DSM 20770	-	n.d.

	Spezies	Stammbezeichnung	PCR	Hybridisierung
5	<i>Pediococcus parvulus</i>	DSM 20332	-	n.d.
	<i>Campylobacter jejuni subsp. jejuni</i>	DSM 4688	-	n.d.
	<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30040	-	n.d.
10	<i>Shigella flexneri</i>	DSM 4782	-	n.d.
	<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	DSM 2834	-	n.d.
	<i>Pediococcus inopinatus</i>	DSM 20285	-	n.d.
	<i>Proteus mirabilis</i>	BioteCon 4701	-	n.d.
15	<i>Megasphaera cerevisiae</i>	DSM 20461	-	n.d.
	<i>Escherichia coli</i>	BioteCon 4949	-	n.d.

n.d.: Die Hybridisierung wurde nicht durchgeführt

Patentansprüche

1. Nucleinsäuremolekül, dadurch gewinnbar, daß man
 - (a) in an sich bekannter Weise aus einem Staphylococcus-Stamm (erster Stamm) genomische DNA isoliert,
 - (b) in an sich bekannter Weise die 23S/5S-intergenische Region gegebenenfalls dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (erstes Amplifikationsprodukt),
 - (c) mit einem zweiten, dritten und/oder nten Staphylococcus-Stamm jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomische DNA isoliert, die 23S/5S-intergenische Region mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, drittes, . . . , ntes Amplifikationsprodukt),
 - (d) in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsprodukts gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c) vergleicht und
 - (e) als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül isoliert und gewinnt, mit dessen Hilfe sich eine nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus Staphylococcus von einer nicht nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus Staphylococcus anhand von Unterschieden an mindestens einer Nucleotidposition im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.
2. Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 1 oder der hierzu komplementären Sequenz.
3. Nucleinsäuremolekül mit gegenüber einem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 2 verkürzter Sequenz, und zwar einer Sequenz
 - (i) des Bereichs oder im Bereich der Nucleotidpositionen 54 bis 83 oder
 - (ii) des Bereichs oder im Bereich der Nucleotidpositionen 100 bis 166.
4. Nucleinsäuremolekül mit gegenüber einem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 2 verkürzter Sequenz, nämlich
 - (i) der SEQ ID NO 2 oder
 - (ii) der SEQ ID NO 3 oder
 - (iii) der SEQ ID NO 4 oder
 - (iv) der zu (i), (ii) und (iii) jeweils komplementären Sequenz.
5. Nucleinsäuremolekül, dadurch gekennzeichnet, daß es hinsichtlich seiner Sequenz bei mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden seiner Nucleotidkette
 - (i) mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche identisch ist oder
 - (ii) in 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder
 - (iii) in 8 von 10 aufeinanderfolgenden Nucleotiden mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder
 - (iv) zu mindestens 90% mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche homolog ist.
6. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es 10 bis 250 und vorzugsweise 15 bis 30 Nucleotide lang ist, insbesondere dadurch gekennzeichnet, daß es das Nucleinsäuremolekül mit der Sequenz SEQ ID NO 5 ist.
7. Nucleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegt.
8. Nucleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es
 - (i) als DNA oder
 - (ii) als (i) entsprechende RNA oder
 - (iii) als PNA vorliegt,

wobei das Nucleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, an sich bekannten Weise modifiziert ist.

9. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Nucleinsäuremolekül dadurch modifiziert ist, daß bis zu 10% der Nucleotide, insbesondere 1 oder 2 Nucleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analoge Bausteine ersetzt sind, insbesondere durch Nucleotide, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen. 5

10. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 8 oder 9 dadurch gekennzeichnet, daß das Nucleinsäuremolekül dadurch oder zusätzlich dadurch modifiziert bzw. markiert ist, daß es in einer für analytische Nachweisverfahren an sich bekannten Weise ein oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase und/oder Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere eine enzymatische Reaktion, aufweist, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen, oder daß es in einer für analytische Nachweisverfahren an sich bekannten Weise andersartig modifizierte bzw. modifizierende Gruppen aufweist. 10

11. Kit für analytische Nachweisverfahren, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Staphylococcus*, gekennzeichnet durch ein oder mehrere Nucleinsäuremoleküle gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche. 15

12. Verwendung von einem oder mehreren Nucleinsäuremolekülen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 oder eines Kits gemäß Anspruch 11 zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien, welche einer Gruppe von Bakterien der Gattung *Staphylococcus* angehören.

13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Gruppe von Bakterien der Gattung *Staphylococcus* verschiedene Stämme von *Staphylococcus aureus* umfaßt. 20

14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Gruppe von Bakterien der Gattung *Staphylococcus* ausschließlich um *Staphylococcus aureus*-Stämme handelt.

15. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nucleinsäurehybridisierung und/oder eine Nucleinsäureamplifikation durchführt.

16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Polymerase-Kettenreaktion als Nucleinsäureamplifikation durchführt. 25

17. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man den Nachweis dadurch durchführt, daß man die nachzuweisenden Bakterien von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nucleotidposition im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 unterscheidet. 30

18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß man anhand von Unterschieden im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls gemäß Anspruch 2 unterscheidet. 35

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -